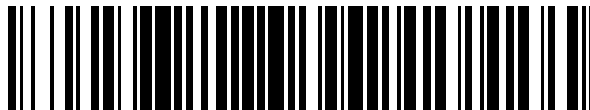


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 503**

51 Int. Cl.:
C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05796103 .9**
- 96 Fecha de presentación: **08.09.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1799236**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Células estromales vivas para la prevención y tratamiento de respuestas inmunológicas al trasplante**

30 Prioridad:
10.09.2004 US 609077 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
COGNATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4800 Montgomery Lane, Suite 801
Bethesda, MD 20814, US

72 Inventor/es:
MCINTOSH, KEVIN, R.

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 390 503 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células estromales vivas para la prevención y tratamiento de respuestas inmunológicas al trasplante

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El hígado es un órgano dinámico que desempeña un papel importante en una diversidad de procesos fisiológicos. Entre las complejas funciones del hígado se incluyen el metabolismo, el almacenamiento, la excreción, la secreción de proteínas plasmáticas, tales como la albúmina, y la detoxificación de sustancias perjudiciales por parte de enzimas del sistema del citocromo P-450. Además, el hígado habitualmente quiescente también es capaz de notables actividades mitóticas bajo determinadas circunstancias. La población celular más importante del hígado son las células parenquimales (PC), también conocidas como hepatocitos. El hígado también contiene otros tipos celulares, tales como células endoteliales, adipocitos, células fibroblásticas y células de Kupffer. La capacidad de las células hepáticas de experimentar una rápida regeneración al resultar dañado o parcialmente eliminado el hígado, convierte al hígado en una fuente potencial de células madre.

En la actualidad se cree que el hígado presenta un sistema de células madre y linajes con varias similitudes con los sistemas intestinal, de la piel y hematopoyético (Sigal *et al.*, Amer. J. Physiol. 263:139-148, 1993). Como tales, existen poblaciones celulares progenitoras en el hígado de los animales de todas las edades. Estas células, tras su aislamiento a partir del hígado, puede servir como potenciales candidatos para la terapia celular.

El sistema inmunológico del mamífero desempeña un papel crucial en la protección de los individuos frente a agentes infecciosos y en la prevención del crecimiento tumoral. Sin embargo, el mismo sistema inmunológico puede producir efectos no deseables, tales como el rechazo de trasplantes de células, tejidos y órganos procedentes de donantes no emparentados. El sistema inmunológico no distingue los intrusos beneficiosos, tales como un tejido transplantado, de los que resultan perjudiciales, y de esta manera el sistema inmunológico rechaza los tejidos u órganos transplantados. El rechazo de los órganos transplantados generalmente se encuentra mediado por células T alorreactivas presentes en el huésped que reconocen aloantígenos o xenoantígenos del donante.

La tolerancia inmunológica es una falta de sensibilidad a un antígeno específico inducida activamente como resultado de la inactivación funcional inducida por un antígeno o la muerte de linfocitos que son específicos para dicho antígeno. Los antígenos que inducen dicha tolerancia se denominan "tolerógenos", con el fin de distinguirlos de inmunógenos que son antígenos que generan respuestas inmunológicas. Un mecanismo de tolerancia de las células B y de falta de producción de anticuerpos implica la interacción de antígenos con células B específicas (la primera etapa en la activación de las células B) en ausencia de estimulación por parte de células T ayudantes u otras células presentadoras de antígenos (la segunda etapa en la activación de las células B). Se han propuesto otros mecanismos de tolerancia de las células B. Por ejemplo, las células B pueden convertirse en anérgicas debido a un bloqueo en la señalización mediada por inmunoglobulinas superficiales ("competición de antígenos"), en ausencia de células T. Además, en ausencia de coestimulación por parte de una célula presentadora de antígenos, el entrecruzamiento fuerte de inmunoglobulinas de la superficie de las células B con un antígeno puede inducir la muerte apoptótica de las células B maduras normales, aunque podría no inducir la apoptosis de células B que producen anticuerpos autoinmunológicos (Tsubata *et al.*, Curr. Biol. 4:8-17, 1994).

La tolerancia de las células T se consigue: 1) en el timo, en donde se eliminan los timocitos reactivos para autopéptidos mediante delección clonal (tolerancia central), y 2) en la periferia, por exposición a autoantígenos bajo condiciones tolerogénicas (tolerancia periférica). La delección clonal también puede resultar de la expresión de moléculas de muerte celular sobre células presentadoras de antígenos. Son ejemplos clásicos de moléculas de muerte celular el ligando Fas (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (ligando TRAIL), que se une a sus receptores, Fas y DR4, respectivamente, sobre las células T activadas, induciendo la apoptosis de las células T. La interacción de CD27, un miembro de la superfamilia de TNFR, y el ligando CD27 (CD70) también induce la apoptosis de las células T.

El trasplante de células, tejidos y órganos entre individuos genéticamente dispares se asocia invariablemente al riesgo de rechazo del injerto. La práctica totalidad de las células expresan productos del complejo de histocompatibilidad mayor, las moléculas del MHC de clase I. Además, muchos tipos celulares pueden ser inducidos a expresar moléculas del MHC de clase II al exponerse a citoquinas inflamatorias. Entre las moléculas inmunogénicas adicionales se incluyen las derivadas de los antígenos de histocompatibilidad menores, tales como antígenos del cromosoma Y reconocidos por receptores femeninos. El rechazo de aloinjertos se encuentra mediado principalmente por células T de las subclases tanto CD4 como CD8 (Rosenberg *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 10:333, 1992). Las células T CD4 alorreactivas producen citoquinas que exacerban la respuesta citolítica de CD8 frente al aloantígeno. Dentro de dichas subclases, se desarrollan subpoblaciones celulares competidoras tras la estimulación con antígenos que se caracterizan por las citoquinas que producen. Las células Th1, que producen IL-2 e IFN- γ , participan principalmente en el rechazo del aloinjerto (Mossmann *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 7:145, 1989). Las

células Th2, que producen IL-4 e IL-10, pueden regular negativamente las respuestas a Th1 mediante IL-10 (Fiorentino *et al.*, J. Exp. Med. 170:2081, 1989). En efecto, se han dedicado muchos esfuerzos a desviar respuestas a Th1 no deseables hacia la ruta de Th2. Las respuestas de células T alorreactivas no deseables en los pacientes (rechazo del aloinjerto, enfermedad injerto contra huésped) típicamente se tratan con fármacos inmunosupresores, tales como prednisona, azatioprina y ciclosporina A. Desafortunadamente, estos fármacos generalmente deben administrarse durante toda la vida del paciente y presentan multitud de efectos secundarios peligrosos, incluyendo la inmunosupresión generalizada.

Un objetivo importante del trasplante de órganos es la injertación permanente del órgano del donante sin inducir una respuesta inmunológica de rechazo del injerto por parte del receptor, conservando simultáneamente la inmunocompetencia del receptor frente a otros antígenos foráneos. Típicamente, con el fin de evitar las respuestas de rechazo del huésped, se utilizan agentes inmunosupresores no específicos, tales como ciclosporina, metotrexato, esteroides y FK506. Estos agentes deben administrarse diariamente y si se detiene la administración, habitualmente resulta el rechazo del injerto. Sin embargo, un problema importante de la utilización de agentes inmunosupresores no específicos es que funcionan suprimiendo la totalidad de los aspectos de la respuesta inmunológica, incrementando en gran medida de esta manera la susceptibilidad de un receptor a la infección y a otras enfermedades, incluyendo el cáncer.

Además, a pesar de la utilización de agentes inmunosupresores, el rechazo del injerto sigue siendo una fuente importante de morbilidad y mortalidad en el trasplante de órganos en el ser humano. La mayoría de trasplantes humanos fallan en menos de 10 años sin aceptación permanente del injerto. Sólo 50% de los trasplantes de corazón sobreviven 5 años y 20% de los trasplantes de riñón sobreviven 10 años (Opelz *et al.*, Lancet 1:1223, 1981).

Actualmente se cree que un trasplante con éxito depende de la prevención y/o reducción de una respuesta inmunológica no deseada de un huésped frente a un trasplante mediada por células efectoras inmunológicas para evitar el rechazo del tejido del donante por parte del huésped. También resulta ventajoso para un trasplante con éxito un método para eliminar o reducir una respuesta inmunológica no deseada por parte de un tejido donante contra un tejido receptor, conocido como enfermedad injerto contra el huésped. De esta manera, existe una necesidad desde hace mucho tiempo de métodos para suprimir, o de otro modo evitar, una respuesta inmunológica no deseada asociada al trasplante de células, tejidos y órganos entre individuos genéticamente dispares. La presente invención satisface dicha necesidad.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

La invención incluye un método para reducir una respuesta inmunológica frente a un trasplante en un receptor mediante el tratamiento del receptor con una cantidad de células estromales vivas (LSC) efectiva para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. La invención también incluye un método para inducir una respuesta inmunológica reducida contra un huésped por parte de tejido foráneo, es decir, la enfermedad del injerto contra el huésped, mediante el tratamiento con las LSC. Las LSC pueden administrarse antes, simultáneamente o después del trasplante.

La invención también incluye un método para tratar un receptor de un trasplante para reducir en el receptor una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, que comprende administrar LSC en un receptor de trasplante en una cantidad efectiva para reducir una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, en la que en el receptor del trasplante las células efectoras presentan una respuesta inmunológica reducida contra el aloantígeno.

En una realización, la célula efectora es una célula T.

En otra realización, la célula T procede de un donante y el aloantígeno procede del receptor.

En otra realización, la célula T procede de un receptor y el aloantígeno procede de un donante.

En todavía otra realización, la célula T se encuentra presente en el trasplante.

En una realización adicional, el trasplante es de médula ósea.

En otra realización, el trasplante es una célula madre hematopoyética. En una realización, el trasplante es una célula madre neural.

En una realización adicional, las LSC se expanden en cultivo previamente a la administración en un receptor de trasplante.

En otra realización, las células efectoras son células T procedentes de un donante previamente activado mediante la puesta en contacto de las células T con una célula o un tejido procedente del receptor previamente al trasplante con el fin de activar las células T, y además en el que la respuesta inmunológica es la reactivación de las células T.

- 5 En otra realización, las LSC se administran en el receptor del trasplante para tratar el rechazo del trasplante por parte del receptor.

En todavía otra realización, las LSC son LSC humanas.

- 10 En una realización, el método comprende además administrar en el receptor un agente inmunosupresor.

En una realización, el trasplante es un órgano sólido. Preferentemente, el órgano sólido se selecciona de entre el grupo que consiste de corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

- 15 En una realización adicional, las LSC se administran por vía intravenosa en el receptor.

En otra realización, las células efectoras son células de un receptor del trasplante del donante.

En todavía otra realización, las LSC han sido modificadas genéticamente.

- 20 La invención también incluye un método para tratar un receptor de un trasplante para reducir en el receptor una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, que comprende transplantar en un receptor de trasplante un trasplante tratado con LSC en una cantidad efectiva para reducir una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, en la que en el receptor del trasplante las células efectoras presentan una respuesta inmunológica reducida contra el aloantígeno.

- 25 La invención también incluye un método para reducir una respuesta inmunológica de células efectoras contra células alogénicas, que comprende tratar las células efectoras con LSC.

- 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La descripción resumida anterior, así como la descripción detallada siguiente de la invención, se entenderá mejor leída conjuntamente con los dibujos adjuntos. A título ilustrativo de la invención, se muestran en los dibujos una o más realizaciones que actualmente son preferentes. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se encuentra limitada a las disposiciones e instrumentos exactos mostrados.

- 35 La figura 1 es un gráfico que ilustra la inmunogenicidad de las células estromales hepáticas (LSC).

La figura 2 es un gráfico que ilustra la supresión de la respuesta mixta de linfocitos (MLR) por parte de células fibroblásticas y estromales derivadas de diversas fuentes.

- 40 La figura 3 es un gráfico que demuestra que las células madre neurales (NSC) estimulan la proliferación de las células T alogénicas.

La figura 3 es un gráfico que demuestra que las células madre neurales (NSC) estimulan la proliferación de las células T alogénicas.

- 45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las células estromales derivadas del hígado (LSC) presentan nuevas características inmunológicas y que por lo tanto pueden resultar útiles en el trasplante de un injerto, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, mediante la reducción y/o eliminación de la respuesta inmunológica contra el trasplante por parte del sistema inmunológico del propio receptor. Tal como se describe en mayor detalle posteriormente, las LSC desempeñan un papel en la inhibición y/o prevención del rechazo del injerto de un trasplante.

- 50 La presente invención se refiere al descubrimiento de que las células estromales derivadas del hígado (LSC) presentan nuevas características inmunológicas y que por lo tanto pueden resultar útiles en el trasplante de un injerto, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, mediante la reducción y/o eliminación de la respuesta inmunológica contra el trasplante por parte del sistema inmunológico del propio receptor. Tal como se describe en mayor detalle posteriormente, las LSC desempeñan un papel en la inhibición y/o prevención del rechazo del injerto de un trasplante.

Además, los datos dados a conocer en la presente memoria también demuestran que las LSC resultan útiles en la inhibición y/o prevención de una respuesta inmunológica no deseada por parte del trasplante de un donante, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, contra un tejido del receptor, conocido como enfermedad del injerto contra el huésped.

- 55 Además, los datos dados a conocer en la presente memoria también demuestran que las LSC resultan útiles en la inhibición y/o prevención de una respuesta inmunológica no deseada por parte del trasplante de un donante, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, contra un tejido del receptor, conocido como enfermedad del injerto contra el huésped.

Por consiguiente, la presente invención comprende métodos y composiciones para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica a un trasplante en un receptor mediante el tratamiento del receptor con una cantidad de LSC efectiva para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. También se encuentran comprendidos los métodos y composiciones para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica en un huésped por el trasplante foráneo contra el huésped, es decir, la enfermedad del injerto contra el huésped, mediante el

- 60 Por consiguiente, la presente invención comprende métodos y composiciones para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica a un trasplante en un receptor mediante el tratamiento del receptor con una cantidad de LSC efectiva para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. También se encuentran comprendidos los métodos y composiciones para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica en un huésped por el trasplante foráneo contra el huésped, es decir, la enfermedad del injerto contra el huésped, mediante el

tratamiento del trasplante del donante y/o del receptor de las células estromales hepáticas del trasplante, con el fin de inhibir o reducir una respuesta adversa del trasplante del donante contra el receptor.

Definiciones

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado al mismo en la presente sección.

10 Los artículos "uno" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o más (es decir, por lo menos a uno) objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o a más de un elemento.

15 El término "aproximadamente" será entendido por el experto ordinario en la materia y variará en cierto grado dependiendo del contexto en el que se utilice.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "autólogo" pretende referirse a cualquier material derivado del mismo individuo en el que posteriormente se reintroducirá.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "red biocompatible" pretende referirse a un sustrato que puede facilitar la formación de estructuras tridimensionales que ayuden al desarrollo de un tejido. De esta manera, pueden cultivarse o sembrarse células sobre dicha malla biocompatible, tal como una que incluya material de matriz extracelular, polímeros sintéticos, citoquinas, factores de crecimiento, etc. La malla puede moldearse en formas deseadas para facilitar el desarrollo de tipos de tejido. Además, por lo menos en una etapa temprana del cultivo de las células, el medio y/o el sustrato se suplementa con factores (por ejemplo factores de crecimiento, citoquinas, material de matriz extracelular, etc.) que facilitan el desarrollo de tipos y estructuras de tejido apropiadas.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "células estromales de médula ósea", "células estromales", "células madre mesenquimales" o "MSC" se utilizan intercambiamente y se refieren a una fracción reducida de células en la médula ósea que pueden servir como precursores similares a células madre de osteocitos, condrocitos, monocitos y adipocitos. Las células estromales de médula ósea han sido estudiadas extensivamente (Castro-Malaspina *et al.*, Blood 56:289-301; Piersma *et al.*, Exp. Hematol. 13:237-243, 1985; Simmons *et al.*, Blood 78:55-62, 1991; Beresford *et al.*, J. Cell. Sci. 102:341-351, 1992; Liesveld *et al.*, Blood 73: 1794-1800, 1989; Liesveld *et al.*, Exp. Hematol 19:63-70, 1989; Bennett *et al.*, J. Cell. Sci. 99:131-139, 1991). Las células estromales de médula ósea pueden derivarse de cualquier animal. En algunas realizaciones, las células estromales se derivan de primates, preferentemente de seres humanos.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "célula estromal hepática" o "LSC" se refiere a una pequeña fracción de células de tipo fibroblástico derivadas del hígado. Las LSC, al ponerse en contacto con las células T de un individuo que no es el mismo individuo del que se han obtenido las LSC, no inducen una respuesta de células T. Además, las LSC son capaces de suprimir la proliferación de células T aloreactivas durante una respuesta inmunológica. Por ejemplo, las LSC pueden suprimir una reacción mixta de linfocitos (MLR) entre las células T alogénicas y las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC).

40 La expresión "célula madre neural", o "NSC", se utiliza en la presente memoria para referirse a una célula neural autorenovante multipotente no diferenciada. Una célula madre neural es una célula madre multipotente clonogénica que es capaz de dividirse y, bajo condiciones apropiadas, presenta la capacidad de autorenovación y puede diferenciarse terminalmente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Por lo tanto, la célula madre neural es "multipotente" debido a que la progenie de la célula madre presente múltiples rutas de diferenciación. Una célula madre neural es capaz de automantenimiento, refiriéndose a que con cada división celular una célula hija también será, de promedio, una célula madre.

45 El término "injerto" se refiere a una célula, tejido, órgano u otra matriz biológicamente compatible para el trasplante.

50 El término "alogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

55 El término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

60 El término "trasplante" se refiere a una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula de un donante, que debe trasplantarse. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, aunque sin limitación, piel, médula ósea y órganos sólidos, tales como corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

Tal como se define en la presente memoria, una "célula estromal hepática (LSC) alogénica" se obtiene de un individuo diferente de la misma especie que el receptor.

La expresión "antígeno del donante" se refiere a un antígeno expresado por el tejido del donante que debe trasplantarse en el receptor.

5 El término "aloantígeno" se refiere a un antígeno que difiere de un antígeno expresado por el receptor.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "célula efectora" se refiere a una célula que media en una respuesta inmunológica contra un antígeno. En la situación en la que se introduce un trasplante en un receptor, las células efectoras pueden ser las propias células del receptor que inducen una respuesta inmunológica contra un antígeno presente en el trasplante del donante. En otra situación, la célula efectora puede ser parte del trasplante, en donde la introducción del trasplante en un receptor resulta en que las células efectoras presentes en el trasplante inducen una respuesta inmunológica contra el receptor del trasplante.

15 La expresión "tratar un receptor de trasplante para reducir en dicho receptor una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras", tal como se utiliza la expresión en la presente memoria, se refiere a reducir la respuesta inmunológica endógena contra el aloantígeno en un receptor mediante cualquier método, por ejemplo administrando las LSC en un receptor, en comparación con la respuesta inmunológica endógena en un animal por lo demás idéntico que no ha sido tratado con LSC. La reducción de la respuesta inmunológica endógena puede evaluarse utilizando los métodos dados a conocer en la presente memoria o mediante cualquier otro método de evaluación de la respuesta inmunológica endógena en un animal.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "medio de crecimiento" se refiere a un medio de cultivo que estimula el crecimiento de las células. Un medio de crecimiento puede contener suero animal, aunque éste no es siempre un componente necesario en el sentido de que el medio de crecimiento también puede no contener suero.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "producto factor de crecimiento" se refiere a una proteína, péptido, mitógeno u otra molécula que presenta un efecto de crecimiento, proliferativo, diferenciador o trófico sobre una célula. Por ejemplo, entre los productos factor de crecimiento que resultan útiles en el tratamiento de los trastornos del SNC se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), las neurotrofinas (NT-3, NT-4/NT-5), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la anfirregulina, FGF-1, FGF-2, EGF, TGF α , los TGF β , PDGF, los IGF, y las interleuquinas, IL-2, IL-12 e IL-13.

35 El "inmunofenotipo" de una célula se utiliza en la presente memoria para referirse al fenotipo de una célula en términos del perfil de proteínas superficiales de una célula.

Una "célula aislada" se refiere a una célula que ha sido separada de otros componentes y/o células que acompañan naturalmente la célula aislada en un tejido o mamífero.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "modula" pretende referirse a cualquier cambio de estado biológico, es decir incremento, reducción y similar.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "no inmunogénico" pretende referirse al descubrimiento de que las LSC no inducen la proliferación de las células T en una MLR. Sin embargo, la expresión "no inmunogénico" no debería limitarse a la ausencia de la inducción de la proliferación de las células T en una MLR, sino que también debería interpretarse que se aplica a la ausencia de proliferación de células T *in vivo* tras la administración de LSC en un animal.

50 El término "proliferación" se utiliza en la presente memoria para referirse a la reproducción o multiplicación de células. Es decir, la proliferación comprende la producción de un mayor número de células, y puede medirse mediante, entre otros, el simple recuento del número de células, la medición de la incorporación de ³H-timidina en la célula, y similares.

55 La expresión "medio de células estromales" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un medio útil para el cultivo de las LSC. Un ejemplo no limitativo de un medio de células estromales es un medio que comprende DMEM/medio F12 de Ham, suero de feto bovino al 10%, 100 U de penicilina/100 μ g de estreptomycin/0,25 μ g de fungizona. Típicamente, el medio de células estromales comprende un medio de base, suero y un antibiótico/antimicótico. Sin embargo, las LSC pueden cultivarse en un medio de células estromales sin un antibiótico/antimicótico y suplementado con por lo menos un factor de crecimiento. El medio de base preferente es DMEM/F12 (1:1). El suero preferente es el suero fetal bovino (FBS), aunque pueden utilizarse otros sueros, incluyendo el suero de caballo o el suero humano. Preferentemente se añade hasta 20% de FBS al medio anteriormente indicado con el fin de proporcionar soporte al crecimiento de las células estromales. Sin embargo, puede utilizarse un medio definido en el caso de que se identifiquen los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas necesarios en FBS para el crecimiento de las células estromales y se proporcionen a concentraciones

- apropiadas en el medio de crecimiento. Se reconoce además que pueden añadirse componentes adicionales al medio de cultivo. Entre dichos componentes se incluyen, aunque sin limitación, antibióticos, antimicóticos, albúmina, factores de crecimiento, aminoácidos y otros componentes conocidos de la técnica para el cultivo de células. Entre los antibióticos que pueden añadirse al medio se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la penicilina y la estreptomina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomina en el medio de cultivo es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 µg/ml. Sin embargo, la invención no debería interpretarse en modo alguno como limitada a un medio cualquiera de cultivo de células estromales. Por el contrario, puede utilizarse cualquier medio capaz de proporcionar soporte a células estromales en cultivo de tejidos.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es la cantidad de LSC que resulta suficiente para proporcionar un efecto beneficioso en el que se administren las LSC.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, "endógeno" se refiere a cualquier material procedente o producido en el interior de un organismo, célula o sistema.
- El término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido en el exterior de un organismo, célula o sistema o producido en el exterior de cualquiera de los mismos.
- El término "codificante" se refiere a una propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, de servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que presentan una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos, y las propiedades biológicas que resultan de las mismas. De esta manera, un gen codifica una proteína en el caso de que la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a dicho gen produzca la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en los listados de secuencias, y la cadena no codificante, utilizada como el molde para la transcripción de un gen o ADNc, se denominan codificantes de la proteína u otro producto de dicho gen o ADNc.
- A menos que se indique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de sí mismas y que codifican la misma secuencia de aminoácido. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.
- Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido separado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que normalmente son contiguas al fragmento, por ejemplo las secuencias contiguas al fragmento en un genoma en el que se encuentra naturalmente. La expresión también se aplica a ácidos nucleicos que han sido sustancialmente purificados de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, por ejemplo ARN o ADN o proteínas, que naturalmente lo acompañan en la célula. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte, o que existe en forma de molécula separada (por ejemplo de ADNc o de fragmento genómico o de ADNc producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido codificante de secuencias polipeptídicas adicionales.
- En el contexto de la presente invención, se utilizan las abreviaturas siguientes para las bases de ácidos nucleicos presentes comúnmente. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.
- Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede utilizarse para administrar el ácido nucleico aislado en el interior de una célula. Se conocen de la técnica numerosos vectores, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. De esta manera, el término "vector" incluye un plásmido o virus de replicación autónoma. El término también debe interpretarse que incluye compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de ácidos nucleicos al interior de las células, tales como, por ejemplo, compuestos polilissina, liposomas y similares. Entre los ejemplos de vectores víricos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos y similares.
- La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operablemente ligadas a una secuencia de nucleótidos que debe expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*.

Entre los vectores de expresión se incluyen aquellos conocidos de la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (porejemplo desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

La expresión "modificación genética" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una alteración estable o transitoria del genotipo de una LSC por la introducción deliberada de ADN exógeno. Preferentemente el ADN exógeno es un ácido nucleico aislado. El ADN puede ser sintético o de origen natural, y puede contener genes, porciones de genes u otras secuencias de ADN útiles. La expresión "modificación genética" tal como se utiliza en la presente memoria no pretende incluir alteraciones naturales, tales como las que se producen por la actividad vírica natural, la recombinación genética natural o similares.

Descripción

La presente invención se refiere al descubrimiento de que al poner en contacto células estromales hepáticas (LSC) con células T obtenidas de un individuo diferente (células T alogénicas), las células T alogénicas no proliferan. El dogma de la técnica anterior sugiere que, al mezclar las células T con cualquier otra célula, tiene lugar la proliferación de las células T. Este fenómeno se conoce como una reacción linfocitaria mixta (MLR). Los datos dados a conocer en la presente memoria demuestran que las células T derivadas de un individuo no son sensibles a las LSC obtenidas de un individuo diferente. Por lo tanto, basándose en la exposición de la presente memoria, las LSC no son inmunogénicas para el sistema inmunológico con respecto a la manifestación de una respuesta de células T.

Además del fenotipo no inmunogénico de las LSC con respecto a los linfocitos T en un individuo diferente, la presente invención se refiere además al nuevo descubrimiento de que las LSC pueden suprimir una MLR entre células alogénicas, por ejemplo entre células T de un individuo y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de otro individuo. Estos inesperados resultados demuestran que las LSC pueden reducir activamente la respuesta de células T alogénicas en las MLR entre células T y PBMC de individuos diferentes. Además, tal como se comenta en mayor detalle en otras partes de la presente memoria, se observa que dicha reducción se produce de una manera dependiente de la dosis. Lo anterior demuestra que las LSC pueden utilizarse como terapia para inhibir el rechazo de un trasplante por parte del huésped, y además, para prevenir o de otra manera inhibir la enfermedad del injerto contra el huésped tras el trasplante.

El experto en la materia apreciará que, basándose en la exposición proporcionada en la presente memoria, la capacidad de las LSC de suprimir una respuesta de células T alogénicas no se encuentra limitada a una MLR entre células T y PBMC de diferentes individuos, sino que las LSC pueden explotarse para incluir la supresión de una MLR entre células T y cualquier tipo de célula de un individuo diferente, por ejemplo una célula madre neural (NSC), una célula hepática, una célula cardíaca, un condrocito, una célula renal, una célula adiposa y similares.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención comprende métodos para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica a un trasplante en un receptor mediante la administración en el receptor del trasplante de una cantidad de LSC que resulte efectiva para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, las LSC que se administran en el receptor del trasplante inhiben la activación y proliferación de las células T del receptor.

I. Aislamiento y cultivo de LSC

Las LSC que resultan útiles en los métodos de la presente invención pueden aislarse utilizando una diversidad de métodos conocidos por el experto en la materia. En un método preferente, se aísla un LSC de un sujeto mamífero, preferentemente un sujeto humano.

Basándose en la exposición proporcionada en la presente memoria, las LSC pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo del donante del tejido, del receptor del trasplante o de una fuente de otro modo no relacionada (un individuo diferente o incluso de una especie diferente). Las LSC pueden ser autólogas con respecto a las células T (obtenidas del mismo huésped) o alogénicas respecto a las células T. En el caso en que las LSC son alogénicas, éstas pueden ser autólogas con respecto al trasplante al que están respondiendo las células T o las LSC pueden obtenerse de un individuo que es alogénico con respecto a tanto la fuente de las células T y la fuente del trasplante al que están respondiendo las células T. Además, las LSC pueden ser xenogénicas respecto a las células T (obtenidas de un animal de una especie diferente), por ejemplo pueden utilizarse LSC de rata para suprimir la activación y proliferación de las células T humanas en las MLR.

En una realización adicional, las LSC utilizadas en la presente invención pueden aislarse del hígado de cualquier especie de mamífero, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, un ser humano, un ratón, una rata, un simio, un gibón, un bovino y similar. Preferentemente las LSC se aíslan a partir de un ratón o una rata. Más preferentemente, las LSC se aíslan a partir de un ser humano.

Basándose en la presente exposición, las LSC pueden aislarse y expandirse en cultivo, es decir, *in vitro*, con el fin de obtener un número suficiente de células para la utilización en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las LSC pueden aislarse a partir de un hígado humano y cultivarse en medio completo (DMEM bajo en glucosa que contiene L-glutamina 4 mM, FBS al 10% y penicilina/estreptomina al 1%). Sin embargo, la invención no debería interpretarse en modo alguno como limitada a un medio cualquiera de aislamiento y cultivo de LSC. Por el contrario, debe interpretarse que cualquier método de aislamiento y cultivo de LSC se encuentra comprendido en la presente invención.

Para el cultivo de LSC puede utilizarse cualquier medio capaz de proporcionar soporte a fibroblastos en cultivo celular. Entre las formulaciones de medio que proporcionan soporte al crecimiento de los fibroblastos se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, medio esencial mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (suero bovino sin albúmina), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con y sin modificación de Fitton-Jackson), medio basal de Eagle (BME sin adición de sal base de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM sin suero), Yamane, IMEM-20, medio de Eagle con modificación de Glasgow (GMEM), medio Leibovitz L35, medio 5A de McCoy, medio M199 (M199E con sal base de Earle), medio M199 (M199H con sal base de Hank), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-E con sal base de Earle), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-H con sal base de Earle) y medio esencial mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales) y similares. Un medio preferente para el cultivo de las LSC es DMEM.

Para el cultivo de LSC puede utilizarse cualquier medio capaz de proporcionar soporte a las LSC *in vitro*. Entre las formulaciones de medios que pueden proporcionar soporte al crecimiento de las LSC se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo α -modificado (α MEM) y medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (medio RPMI 1640) y similares. Típicamente se añade al medio anteriormente indicado suero de feto bovino (FBS) al 0-20% o suero de caballo al 1-20% con el fin de proporcionar soporte al crecimiento de las LSC. Sin embargo, también puede utilizarse un medio definido en el caso de que los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas necesarios para el cultivo de las LSC se proporcionen a concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Los medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, antibióticos, compuestos mitogénicos o de diferenciación útiles para el cultivo de las LSC. Las células pueden incubarse a temperaturas de entre 27°C y 40°C, preferentemente de entre 31°C y 37°C, y más preferentemente en un incubador humidificado. El contenido de dióxido de carbono puede mantenerse entre 2% y 10%, y el contenido de oxígeno, entre 1% y 22%. Sin embargo, la invención no debería interpretarse en modo alguno como limitada a un medio cualquiera de aislamiento y cultivo de LSC. Por el contrario, debe interpretarse que cualquier método de aislamiento y cultivo de las LSC se encuentra comprendido en la presente invención.

Algunos ejemplos no limitativos adicionales de medios que resultan útiles en los métodos de la invención contienen suero fetal de una especie bovina u otra especie a una concentración de entre por lo menos 1% y aproximadamente 30%, preferentemente de entre por lo menos aproximadamente 5% y 15%, más preferentemente de aproximadamente 10%. El extracto embrionario de pollo o de otra especie puede encontrarse presente a una concentración de entre aproximadamente 1% y 30%, preferentemente de entre por lo menos aproximadamente 5% y 15%, más preferentemente de aproximadamente 10%.

Entre los antibióticos que pueden añadirse al medio se incluyen, aunque sin limitación, penicilina y estreptomina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomina en el medio de cultivo es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 μ g/ml.

Tras el aislamiento, las LSC se incuban en medio de cultivo en un aparato de cultivo durante un periodo de tiempo, o hasta que las células alcanzan la confluencia, antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. Tras la siembra inicial en placa, las células pueden mantenerse en cultivo durante un periodo de aproximadamente 6 días, rindiendo la población de fase 0 (P0). Las células pueden subcultivarse un número indefinido de veces, comprendiendo cada pase el cultivo de las células durante aproximadamente 6 a 7 días, durante el que los tiempos de duplicación celular pueden ser de entre 3 y 5 días. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo utilizado comúnmente para cultivar células *in vitro*. Un aparato de cultivo preferente es un matraz de cultivo, y un aparato de cultivo más preferente es un matraz de cultivo T-225.

Las LSC pueden cultivarse en medio de células estromales durante un periodo de tiempo o hasta que las células alcancen un determinado nivel de confluencia. Preferentemente el nivel de confluencia es superior al 70%. Más preferentemente el nivel de confluencia es superior al 90%. Un periodo de tiempo puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio de células estromales puede sustituirse durante el cultivo de las LSC en cualquier momento. Preferentemente, el medio de las células estromales se sustituye cada 3 a 4 días. A continuación, se recolectan las LSC del aparato de cultivo, después de lo cual las LSC pueden utilizarse inmediatamente o pueden conservarse criogénicamente y almacenarse para su utilización posterior. Las LSC

pueden recolectarse mediante tripsinización, tratamiento EDTA o cualquier otro procedimiento utilizado para recolectar células de un aparato de cultivo.

5 Las LSC descritas en la presente memoria pueden conservarse criogénicamente siguiendo procedimientos rutinarios. Preferentemente se conservan criogénicamente aproximadamente uno a diez millones de células en medio de las células estromales que contiene DMSO al 10% en fase vapor de N₂ líquido. Las células congeladas pueden descongelarse removiendo en un baño a 37°C, resuspendiendo en medio de crecimiento fresco y cultivarse del modo habitual.

10 II. Terapia

Tal como se encuentra comprendido en la presente invención, las LSC típicamente se aíslan a partir de un ser humano. En el caso de que la célula de la presente invención deba trasplantarse en un sujeto humano, resulta preferible que las LSC se aíslen del mismo sujeto, de manera que proporcionen un trasplante autólogo. Sin embargo, los trasplantes alogénicos también se encuentran contemplados en la presente invención.

15 De esta manera, en otro aspecto de la invención, las LSC administradas pueden ser alogénicas con respecto al receptor. Una célula LSC alogénica puede aislarse a partir de un donante que sea un individuo diferente de la misma especie que el receptor. Tras el aislamiento, la célula se cultiva utilizando los métodos dados a conocer en la presente memoria para producir un producto alogénico. La invención también comprende una LSC que es xenogénica con respecto al receptor.

20 Otra realización de la presente invención comprende la vía de administración de las LSC en el receptor del trasplante. Las LSC pueden administrarse mediante una vía que resulte adecuada para la implantación del trasplante, es decir, una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula del donante, que debe trasplantarse. Las LSC pueden administrarse sistémicamente, es decir, parenteralmente, mediante inyección intravenosa, o pueden dirigirse a un tejido u órgano particular, tal como médula ósea. Las LSC pueden administrarse mediante una implantación subcutánea de células o mediante la inyección de las células en tejido conectivo, por ejemplo músculo.

25 Las LSC pueden suspenderse en un diluyente apropiado, a una concentración de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5×10^6 células/ml. Son excipientes adecuados para soluciones para inyección las que sean biológica y fisiológicamente compatibles con las LSC y con el receptor, tales como solución salina tamponada u otros excipientes adecuados. La composición para la administración puede formularse, producirse y almacenarse según métodos estándares, cumpliendo las condiciones correctas de esterilidad y estabilidad.

30 La dosis de las LSC varía dentro de amplios límites y puede ajustarse a los requisitos individuales en cada caso particular. El número de células utilizado depende del peso y condición del receptor, del número y/o frecuencia de las administraciones y de otras variables conocidas por el experto en la materia.

35 Pueden administrarse en el individuo entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} LSC por cada 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones se administran entre $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ células por cada 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones se administran entre 1×10^9 y aproximadamente 5×10^{11} células por cada 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones se administran entre 4×10^9 y aproximadamente 2×10^{11} células por cada 100 kg de peso corporal. En algunas realizaciones se administran entre 5×10^8 y aproximadamente 1×10^1 células por cada 100 kg de peso corporal.

40 III. Resección en el huésped

45 En otra realización de la presente invención, las LSC se administran en el receptor antes o durante un trasplante con el fin de reducir y/o eliminar el rechazo del trasplante por parte del huésped. Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, las LSC pueden utilizarse para acondicionar el sistema inmunológico del receptor al trasplante mediante la administración de LSC en el receptor antes o durante la implantación del trasplante, en una cantidad efectiva para reducir, inhibir o eliminar una respuesta inmunológica contra el trasplante por parte de las células T del receptor. Las LSC afectan a las células T del receptor de manera que la respuesta de células T se reduce, inhibe o elimina al resultar expuestas al trasplante. De esta manera, el rechazo del trasplante por parte del huésped puede evitarse, o reducirse la severidad del mismo, mediante la administración de LSC en el receptor antes o durante el trasplante.

50 En todavía otra realización, las LSC pueden administrarse en el receptor del trasplante después de la administración del mismo. Además, la presente invención comprende un método de tratamiento de un paciente que experimenta una respuesta inmunológica adversa a un trasplante mediante la administración de LSC en el paciente en una cantidad efectiva para reducir, inhibir o eliminar la respuesta inmunológica al trasplante, también conocido como rechazo del trasplante por parte del huésped.

5 La invención se basa en el descubrimiento de que las LSC no estimulan la proliferación de células T alogénicas. Como tales, la invención comprende la utilización de ISC para suprimir la proliferación de las células T en respuesta al trasplante de un órgano, tejido o células exógenas. La invención incluye además un método de administración de una LSC en un paciente en una cantidad efectiva para reducir una respuesta inmunológica con respecto a la proliferación de las células T.

10 El experto en la materia apreciará, basándose en la exposición proporcionada en la presente memoria, que las LSC pueden explotarse para incluir la supresión de la proliferación de las células T en respuesta a cualquier tipo de órgano, tejido o célula trasplantado en un mamífero y obtenido de un individuo diferente. Por ejemplo, la proliferación de las células T en respuesta a una célula, incluyendo, aunque sin limitación, una célula madre neural (NSC), una célula hepática, una célula cardíaca, un condrocito, una célula renal, una célula adiposa y similar, puede suprimirse utilizando las LSC.

15 La presente invención comprende un método para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica a un trasplante en un receptor mediante la administración en el receptor del trasplante de una cantidad de LSC efectiva para reducir o inhibir el rechazo del trasplante por parte del huésped. Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, las LSC que se administran en el receptor del trasplante inhiben la activación y proliferación de las células T del receptor.

20 El trasplante se refiere a una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula de un donante, que debe transplantarse. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, aunque sin limitación, células madre, células o tejido de la piel, médula ósea, células madre neurales, y órganos sólidos, tales como corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

25 IV. Enfermedad del injerto contra el huésped

30 Además de métodos para reducir y/o eliminar el rechazo del huésped al trasplante, la presente invención también proporciona un método para reducir y/o eliminar una respuesta inmunológica de un trasplante del donante contra un receptor del mismo (es decir, una reacción del injerto contra el huésped). Por consiguiente, la presente invención comprende un método para poner en contacto un trasplante de un donante, por ejemplo una malla biocompatible o un tejido, órgano o célula de un donante, con LSC previamente a la implantación del trasplante en un receptor. Las LSC sirven para mejorar, inhibir o reducir una respuesta adversa del trasplante de un donante contra el receptor.

35 La invención se basa en el descubrimiento de que las LSC no estimulan la proliferación de células T alogénicas. Basándose en la exposición presentada en la presente memoria, las LSC pueden suprimir la proliferación de las células T en una reacción MLR. La invención incluye además un método de administración de una LSC en un mamífero en una cantidad efectiva para reducir una respuesta inmunológica con respecto a la proliferación de las células T.

40 Tal como se comenta en otros sitios en la presente memoria, las LSC pueden obtenerse a partir de cualquier fuente, por ejemplo del donante del tejido, del receptor del trasplante o de una fuente de otro modo no relacionada (un individuo diferente o incluso una especie diferente) para la utilización en la eliminación o reducción de una respuesta inmunológica no deseada por un trasplante contra un receptor del trasplante. Por consiguiente, las LSC pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas respecto al donante del tejido, el receptor del trasplante o una fuente de otro modo no relacionada.

45 En una realización de la presente invención, el trasplante se expone a las LSC previamente a la implantación del trasplante en el receptor. En esta situación, una respuesta inmunológica contra el trasplante provocada por cualesquiera células receptoras alorreactivas resultaría suprimida por las LSC presentes en el trasplante. Las LSC son alogénicas respecto al receptor y pueden derivarse del donante o de una fuente diferente del donante o del receptor. En algunos casos, las LSC autólogas respecto al receptor pueden utilizarse para suprimir una respuesta inmunológica contra el trasplante. En otro caso, las LSC pueden ser xenogénicas para el receptor, por ejemplo pueden utilizarse LSC de ratón o de rata para suprimir una respuesta inmunológica en un ser humano. Sin embargo, resulta preferible utilizar LSC humanas en la presente invención.

50 En otra realización de la presente invención, el trasplante del donante puede "preacondicionarse" o "pretratarse" mediante el tratamiento del trasplante previamente a la implantación en el receptor con el fin de reducir la inmunogenicidad del trasplante contra el receptor, reduciendo y/o previniendo de esta manera la enfermedad del injerto contra el huésped. El trasplante puede ponerse en contacto con células o un tejido del receptor previamente a la implantación con el fin de activar las células T que podrían encontrarse asociadas al trasplante. Tras el tratamiento del trasplante con células o un tejido del receptor, las células o tejido pueden ser eliminados del trasplante. A

continuación, el trasplante tratado se pone en contacto adicionalmente con las LSC con el fin de reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T que resultaron activadas por el tratamiento de las células o tejido del receptor. Tras dicho tratamiento del trasplante con LSC, las LSC pueden eliminarse del trasplante previamente al trasplante en el receptor. Sin embargo, algunas LSC podrían adherirse al trasplante y, por lo tanto, podrían haberse introducido en el receptor con el trasplante. En esta situación, las LSC introducidas en el receptor pueden suprimir una respuesta inmunológica contra el receptor causada por cualquier célula asociada al trasplante. Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, el tratamiento del trasplante con LSC previamente a la implantación del trasplante en el receptor sirve para reducir, inhibir o eliminar la actividad de las células T activadas, previniendo de esta manera la reestimulación o la inducción de una hiperrespuesta de las células T a la posterior estimulación antigénica procedente de un tejido y/o de células del receptor. El experto en la materia entenderá basándose en la presente exposición que el precondicionamiento o pretratamiento del trasplante previamente a la implantación puede reducir o eliminar la respuesta de injerto contra el huésped.

Por ejemplo, el contexto del trasplante de médula ósea o células madre sanguíneas periféricas (células madre hematopoyéticas), el ataque del huésped por parte del injerto puede reducirse, inhibirse o eliminarse mediante el precondicionamiento de la médula ósea utilizando los métodos de pretratamiento dados a conocer en la presente memoria para reducir la inmunogenicidad del injerto contra el receptor. Tal como se describe en otros sitios en la presente memoria, la médula del donante puede pretratarse con LSC de cualquier origen, preferentemente con LSC del receptor *in vitro* previamente al trasplante de la médula del donante en el receptor. En una realización preferente, la médula del donante en primer lugar se expone a tejido o células del receptor y después se trata con las LSC. Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que el contacto inicial de la médula del donante con tejido o células del receptor funciona activando las células T en la médula del donante. El tratamiento de la médula del donante con las LSC induce una hiperrespuesta o impide la reestimulación de las células T frente a la estimulación antigénica posterior, reduciendo, inhibiendo o eliminando de esta manera un efecto adverso inducido por la médula del donante en el receptor.

En una realización de la presente invención, un receptor del trasplante que sufre la enfermedad del injerto contra el huésped puede tratarse mediante la administración de las LSC en el receptor con el fin de reducir, inhibir o eliminar la severidad de la misma, en donde las LSC se administran en una cantidad efectiva para reducir o eliminar la enfermedad del injerto contra el huésped.

En la presente realización de la invención, preferentemente las LSC del receptor pueden obtenerse del receptor previamente a la implantación y pueden almacenarse y/o expandirse en cultivo con el fin de proporcionar una reserva de LSC en cantidades suficientes para tratar una reacción en curso del injerto contra el huésped. Sin embargo, tal como se comenta en otros sitios en la presente memoria, las LSC pueden obtenerse de cualquier fuente, por ejemplo de tejido del donante, del receptor del trasplante o de una fuente de otro modo no relacionada (un individuo diferente o incluso una especie diferente).

V. Ventajas de la utilización de las LSC

Basándose en la exposición en la presente memoria se contempla que las LSC de la presente invención puedan utilizarse conjuntamente con los modos actuales, por ejemplo la utilización de terapia con fármacos inmunosupresores, para el tratamiento del rechazo del huésped a tejido del donante o enfermedad del injerto contra el huésped. Una ventaja de la utilización de LSC conjuntamente con fármacos inmunosupresores en el trasplante es que, mediante la utilización de los métodos de la presente invención para reducir la severidad de la respuesta inmunológica en un receptor del trasplante, puede reducirse la cantidad de la terapia con fármacos inmunosupresores y/o la frecuencia de la administración de terapia con fármacos inmunosupresores. Un beneficio de la reducción del uso de terapia con fármacos inmunosupresores es la disminución de la supresión inmunológica general y de efectos secundarios no deseados asociados a la terapia con fármacos inmunosupresores.

También se encuentra contemplado que las células de la presente invención puedan administrarse en un receptor en forma de una terapia única destinada al tratamiento del rechazo por parte del huésped del tejido del donante o enfermedad del injerto contra el huésped. Una administración única de LSC en el receptor del trasplante elimina la necesidad de la terapia crónica con fármacos inmunosupresores. Sin embargo, si se desea, también pueden utilizarse múltiples administraciones de LSC.

La invención descrita en la presente memoria también comprende un método para prevenir o tratar el rechazo del trasplante y/o la enfermedad del injerto contra el huésped mediante la administración de LSC en una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva para la prevención, tratamiento o mejora del rechazo por parte del huésped del trasplante y/o enfermedad del injerto contra el huésped. Basándose en la presente exposición, una cantidad terapéuticamente efectiva de las LSC es una cantidad que inhibe o reduce el número de células T activadas en comparación con el número de células T activadas en ausencia de la administración de las LSC. En la situación de rechazo del trasplante por parte del huésped, una cantidad efectiva de LSC es una cantidad que inhibe o reduce el

número de células T activadas en el receptor del trasplante en comparación con el número de células T activadas en el receptor previamente a la administración de las LSC. En el caso de la enfermedad del injerto contra el huésped, una cantidad efectiva de LSC es una cantidad que inhibe o reduce el número de células T activadas presentes en el trasplante.

5 Una cantidad efectiva de LSC puede determinarse mediante comparación del número de células T activadas en un receptor o en un trasplante previamente a la administración de las LSC en el mismo, con el número de células T activadas presentes en el receptor o en el trasplante tras la administración de las LSC en el mismo. Una reducción, o la ausencia de un incremento, del número de células T activadas en el receptor del trasplante o en el trasplante mismo asociada a la administración de las LSC en el mismo, indica que el número de LSC administradas es una cantidad terapéuticamente efectiva de LSC.

Modificación genética

15 En todavía otra realización de la presente invención, las LSC pueden utilizarse como vehículo de terapia génica para la expresión de un gen exógeno en un mamífero. El beneficio de la utilización de las LSC como vehículo para la terapia génica sobre las células utilizadas actualmente se basa en el nuevo descubrimiento de que las LSC pueden sobrevivir durante periodos de tiempo más prolongados en comparación con las células utilizadas actualmente en la técnica para las aplicaciones de terapia génica.

20 A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones genéticas se llevan a cabo tal como se describe en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 2001). La presente invención comprende LSC genéticamente modificadas, que ha sido manipuladas para expresar un gen exógeno. El gen exógeno puede ser, por ejemplo, una versión exógena de un gen endógeno (por ejemplo puede utilizarse una versión de tipo salvaje del mismo gen para sustituir un alelo defectuoso que comprende una mutación). El gen exógeno habitualmente, aunque no necesariamente, se encuentra unido covalentemente a (es decir, se encuentra "fusionado con") uno o más genes adicionales. Entre los genes "adicionales" ejemplares se incluye un gen útil para la selección "positiva" para seleccionar células que han incorporado el gen exógeno, y un gen útil para la selección "negativa" para seleccionar células que han incorporado el gen exógeno en el mismo locus cromosómico que el gen endógeno, o ambos.

35 Las células de la presente invención también pueden utilizarse para expresar una proteína o molécula foránea con un propósito terapéutico o en un método para seguir su asimilación y/o diferenciación en el receptor. De esta manera, la invención comprende vectores de expresión y métodos para la introducción de un ácido nucleico aislado en LSC con la expresión concomitante del ácido nucleico aislado en las LSC. Los métodos para introducir y expresar ADN en una célula son bien conocidos por el experto en la materia y entre ellos se incluyen los descritos en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 2001) y en Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1997).

40 El ácido nucleico aislado puede codificar una molécula utilizada para realizar un seguimiento de la migración, asimilación y supervivencia de las LSC tras su introducción en el receptor. Entre las proteínas que resultan útiles para realizar un seguimiento de una célula se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la proteína fluorescente verde (GFP), cualquier otra de las proteínas fluorescentes (por ejemplo las proteínas fluorescentes verde mejorada, cian, amarillo, azul y rojo; Clontech, Palo Alto, CA) u otras proteínas etiqueta (por ejemplo LacZ, etiqueta FLAG, Myc, His₆, y similares).

50 El seguimiento de la migración y asimilación de una LSC de la presente invención no se encuentra limitado a la utilización de una molécula detectable expresada por un vector o virus. La migración y asimilación de una célula también puede evaluarse utilizando una serie de sondas que facilitan la localización de las LSC trasplantadas dentro de un mamífero. El seguimiento de un trasplante de LSC puede conseguirse además utilizando sondas de anticuerpos o de ácidos nucleicos para marcadores específicos de células asociados a las LSC.

55 Un ácido nucleico aislado puede introducirse en una LSC utilizando vectores víricos (retrovirus, virus herpes modificado, virus herpes, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus y similares) o mediante transfección directa de ADN (lipofección, transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación y similares).

60 En el caso de que el propósito de la modificación genética de la célula sea la producción de una sustancia biológicamente activa, la sustancia generalmente será una que resulte útil para el tratamiento de un trastorno dado. Por ejemplo, puede desearse la modificación genética de células de manera que secreten un determinado producto factor de crecimiento.

Las células de la presente invención pueden modificarse genéticamente mediante la introducción de un ácido nucleico aislado en las células con el fin de producir una molécula, tal como un factor trófico, un factor de

crecimiento, una citoquina y similares, que resulte beneficiosa para el cultivo de las células. Además, las células genéticamente modificadas pueden proporcionar un efecto terapéutico adicional en el paciente al trasplantarse en un paciente que necesita del mismo.

- 5 Las células también pueden modificarse para expresar un determinado receptor (r) de factor de crecimiento, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, NGFr de baja afinidad p75, CNTFr, la familia trk de receptores de neurotrofina (trk, trkB, trkC), EGFr, FGFr y los receptores de anfiregulina. Las células pueden manipularse para producir diversos neurotransmisores o sus receptores, tales como serotonina, L-dopa, dopamina, norepinefrina, epinefrina, taquiquinina, sustancia P, endorfina, encefalina, histamina, N-metil-D-aspartato, glicina, glutamato, GABA, ACh y similares. Entre los genes sintetizadores de neurotransmisores útiles se incluyen TH, dopa-descarboxilasa (DDC), DBH, PNMT, GAD, triptófano hidroxilasa, ChAT e histidina descarboxilasa. Entre los genes que codifican diversos neuropéptidos que podrían demostrar ser útiles en el tratamiento de los trastornos del SNC se incluyen la sustancia P, el neuropéptido Y, la encefalina, la vasopresina, VIP, el glucagón, la bombesina, la colecistoquinina (CCK), la somatostatina, el péptido relacionado con el gen calcitonina, y similares.
- 10
- 15 Las células de la presente invención también pueden modificarse para expresar una citoquina. La citoquina se selecciona preferentemente, aunque no exclusivamente, de entre el grupo que consiste de IL-12, TNF α , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-7, IL-2, IL-6, IL-15, IL-21 e IL-23

20 Según la presente invención, los constructos génicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas heterólogas se introducen en las LSC. Es decir, las células son alteradas genéticamente para introducir un gen cuya expresión presenta un efecto terapéutico en el individuo. Según algunos aspectos de la invención, las LSC del individuo que debe tratarse o de otro individuo, o de un animal no humano, pueden alterarse genéticamente para sustituir un gen defectuoso y/o para introducir un gen cuya expresión presenta un efecto terapéutico en el individuo bajo tratamiento.

25 En todos los casos en los que se transfecta un constructo génico en una célula, el gen heterólogo se liga operablemente a secuencias reguladoras necesarias para conseguir la expresión del gen en la célula. Entre dichas secuencias reguladoras típicamente se incluyen un promotor y una señal de poliadenilación.

30 El constructo génico preferentemente se proporciona en forma de un vector de expresión que incluye la secuencia codificante de una proteína heteróloga operablemente ligada a secuencias reguladoras esenciales, de manera que al transfectar el vector en la célula, la secuencia codificante será expresada por la célula. La secuencia codificante se encuentra operablemente ligada a los elementos reguladores necesarios para la expresión de dicha secuencia en las células. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede ser ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado o un híbrido de los mismos, o una molécula de ARN, tal como ARNm.

35

El constructo génico incluye la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína beneficiosa operablemente ligada a los elementos reguladores y puede seguir presente en la célula en forma de una molécula citoplasmática funcional, una molécula episómica funcional o puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula. Puede introducirse un ácido nucleico aislado en las células, en donde permanece como material genético separado en forma de plásmido. Alternativamente, puede introducirse en la célula ADN lineal que puede integrarse en el cromosoma. Al introducir ADN en la célula, pueden añadirse reactivos que estimulan la integración del ADN en los cromosomas. También pueden incluirse en la molécula de ADN secuencias de ADN que resultan útiles para estimular la integración. Alternativamente, puede introducirse ARN en la célula.

40

45

Entre los elementos reguladores de la expresión génica se incluyen: un promotor, un codón de inicio, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Resulta preferente que dichos elementos sean operables en las células de la presente invención. Además, resulta preferente que dichos elementos se ligen operablemente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, de manera que la secuencia de nucleótidos pueda ser expresada en las células y, de esta manera, pueda producirse la proteína. Los codones de inicio y los codones de parada se consideran generalmente como parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. Sin embargo, resulta preferente que dichos elementos sean funcionales en las células. De manera similar, los promotores y señales de poliadenilación utilizados deben ser funcionales dentro de las células de la presente invención. Entre los ejemplos de promotores útiles para la práctica de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, promotores activos en muchas células, tales como el promotor de citomegalovirus, promotores de SV40 y promotores retrovíricos. Entre otros ejemplos de promotores útiles para la práctica de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, promotores específicos de tejidos, es decir promotores que funcionan en algunos tejidos pero no en otros; además, promotores de genes normalmente expresados en las células con o sin secuencias intensificadoras específicas o generales. En algunas realizaciones, se utilizan promotores que expresan constitutivamente genes en las células con o sin secuencias intensificadoras. Las secuencias intensificadoras se proporcionan en dichas realizaciones en caso apropiado o deseable.

50

55

60

Las células de la presente invención pueden transfectarse utilizando técnicas bien conocidas fácilmente disponibles

para el experto ordinario en la materia. Puede introducirse un ácido nucleico aislado en las células utilizando métodos estándares, en las que la célula expresa la proteína codificada por el gen. En algunas realizaciones, las células se transfectan mediante la transfección mediante precipitación con fosfato de calcio, la transfección con DEAE-dextrano, la electroporación, la microinyección, la transferencia mediada por liposomas, la transferencia mediada químicamente, la transferencia mediada por ligandos o la transferencia de vector vírico recombinante.

En algunas realizaciones, se utilizan vectores adenovirus recombinantes para introducir ADN con secuencias deseadas en la célula. En algunas realizaciones, se utilizan vectores retrovirus recombinantes para introducir ADN con secuencias deseadas en las células. En algunas realizaciones se utilizan técnicas de transfección mediadas por CaPO₄ estándar, DEAE-dextrano o portador lípido, para incorporar el ADN deseado en células en división. Pueden utilizarse técnicas de selección estándares por resistencia a antibióticos para identificar y seleccionar las células transfectadas. En otras realizaciones se introduce el ADN directamente en las células mediante microinyección. De manera similar, pueden utilizarse técnicas bien conocidas de electroporación o bombardeo con partículas para introducir ADN foráneo en las células. Habitualmente se cotransfecta o se une al gen terapéutico un segundo gen. El segundo gen frecuentemente es un gen seleccionable de resistencia a un antibiótico. Las células transfectadas pueden seleccionarse mediante cultivo de las células en un antibiótico que elimine las células que no incorporan el gen seleccionable. En la mayoría de casos en que los dos genes no se encuentren ligados y han sido cotransfectados, las células que sobrevivan al tratamiento antibiótico presentarán ambos genes en ellas y expresarán ambos.

Debe entenderse que los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo de varias maneras y con diversas modificaciones y permutaciones de las mismas que son bien conocidas de la técnica. También se apreciará que cualesquiera teorías indicadas respecto a los modos de acción o interacciones entre tipos celulares no deben interpretarse como limitativas de la presente invención en modo alguno, sino que se presentan para que los métodos de la invención puedan entenderse más completamente.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente aspectos de la presente invención. Sin embargo, no son en modo alguno limitativos de las enseñanzas o exposición de la presente invención tal como se describe en la presente memoria.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: caracterización de células estromales hepáticas

Producción de LSC

Se utilizaron hígados humanos adultos cadavéricos procedentes de diferentes donantes, denominados Hu027 y Hu029. Se perfundió el hígado por la vena portal y arteria hepáticas con tampón que contenía EGTA durante 15 minutos y colagenasa al 0,06% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) durante 30 minutos a 34°C. A continuación, se pasaron las células por filtros de 1.000, 500, 250 y 150 µm. Se fraccionaron las células viables bajo 500xg con el procesador celular COBE (Gambro BCT, Lakewood, CO) utilizando gradientes en 2 etapas (9% y 17%; células Hu027 y Hu029) o gradientes OptiPrep al 12,5% (células H0107) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega). Las células se congelaron en medio que contenía HypoThermosol al 80% (BioLife Solutions INC., Binghamton, NY), suero AB humano al 10% y dimetilsulfóxido al 10% (Sigma) para el almacenamiento en nitrógeno líquido.

Para el cultivo, las células estromales hepáticas conservadas criogénicamente se descongelaron y se contaron. Los cultivos se sembraron a razón de aproximadamente $1,62 \times 10^6$ células/cm² en medio completo (DMEM bajo en glucosa que contenía L-glutamina 4 mM, FBS al 10% y penicilina/estreptomina al 1%). Se cultivaron las LSC y se utilizaron en experimentos comentados en mayor detalle posteriormente. Se utilizaron métodos conocidos de la técnica para caracterizar el fenotipo de las LSC con respecto a las líneas celulares de BMSC y fibroblastos obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), del modo siguiente:

Análisis de citometría de flujo:

Brevemente, se lavaron las células en PBS que contenía FBS al 5% y se bloquearon con inmunoglobulina previamente a la tinción con anticuerpos etiquetados con fluorocromos. Se determinó la tinción de fondo mediante incubación de las células con inmunoglobulinas marcadas con fluorocromos de isotipos correspondientes. Se utilizaron aproximadamente cincuenta mil sucesos (células) para el análisis de las LSC en un citómetro de flujo FACSCaliber de Becton Dickinson utilizando el software de captura Cell Quest. Los resultados del análisis de flujo se resumen en la Tabla 1. Una denominación "NEG" en la Tabla 1 indica una tinción positiva inferior al 0,01%. Se observó que el marcador de superficie CD14 distinguía las LSC de las BMSC y de las líneas celulares de fibroblastos sometidas a ensayo. Además, se observó que CD133 era un marcador que se encuentra presente a concentración más baja sobre las LSC que sobre las BMSC, y que por lo tanto puede utilizarse como marcador para distinguir las LSC de las BMSC.

TABLA 1:

Perfil de antígenos de superficie (% de células positivas)													
Grupo de	Grupo	Origen de los							BMSC				
		Feto	Pulmón	Piel	Bazo	Tej. conectivo	Hígado	005 (OE)	006 (OE)	008 (OE)	005 (OW)	009 (OW)	
Diferenciación	Distribución	P15	P8	P6	P7	Tejido P10	HV-027 P3	HV-029 P3	P3	P3	P4	P3	P3
CD8	Nº de pase (Células T)	1.9	12	0.7	87	28	0.1	0.95	38	34	1.8	26	
CD11a	LFA-1 α	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.55	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
CD13	APN	91,6	93,3	98	57,2	821	94,2	95,4	81,5	91,8	937	96,5	
CD14	LPS-r	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	138	67	NEG	NEG	NEG	NEG	
CD19	Célula pan-B	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	
CD29	Integrina β -1	83,1	746	92	90,4	70,5	94,5	93,6	67,6	86,7	848	89,3	
CD81	PECAM 1	0,8	0,5	0,5	0,8	0,1	0,9	0,6	0,5	1,3	0,9	0,1	
CD34	Célula madre hemat.	NEG	0,1	NEG	29	1	0,5	64	NEG	0,5	NEG	0,3	
CD40	Coestimulación	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1,9	NEG	NEG	
CD44	HCAM	ND	91,2	94,9	89,3	67,9	96,3	95,4	90,3	86,1	93,1	96,1	
CD45	Pan-leucocito	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,1	NEG	NEG	NEG	NEG	
CD54	ICAM-1	76,2	19,3	46	80,9	736	94	85,2	47	17,9	35,7	49,8	
CD80	B7-1	4,7	1,9	1,6	7,6	39	0,3	1,8	3,9	6	21	25	
CD86	B7-2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	

CD90	Thy-1	92,4	85,7	97,7	93,3	70	95,7	95,5	87,5	77	93,1	90,4	92,4
CD105	Endoglina	26,8	31,5	67,1	80,7	42,8	89,5	90	62,5	55,5	58,5	64,7	435
CD119	INF-γ-r	3,7	2	1,1	0,5	0,5	5,2	52	22,3	0,8	NEG	38	1,3

(continuación)

Perfil de antígenos de superficie (% de células positivas)													
Grupo de	Grupo	Origen de los fibroblastos								BMSC			
		Feto	Pulmón	Piel	Bazo	Tej. conectivo	Hígado	005 (OE)	006 (OE)	008 (OE)	005 (OW)	009 (OW)	
Diferenciación	Nº de pase	P15	P8	P6	P7	Tejido P10	HV-027 P3	HV-029 P3	P3	P3	P4	P3	P3
CD120a	TNFR1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
CD123	IL-3-r	NEG	NEG	27	NEG	0,8	28	1,2	NEG	0,2	0,3	33	NEG
CD132	Cadena común γ	NEG	NEG	NEG	NEG	42	NEG	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
CD133	AC133	11,2	5	4,5	38,6	183	4	7,6	20,2	17,9	27,4	227	35,5
CD212	IL-12-r	NEG	NEG	NEG	NEG	1,6	NEG	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
MHC Clase I		93,5	70,4	35,5	91,8	90,9	96,8	92,9	88,5	761	93,5	89,4	926
MHC Clase II		NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,1	0,2	NEG	NEG	0,1	NEG	NEG

Ensayo de diferenciación de células estromales derivadas de hígado:

Se llevaron a cabo ensayos de diferenciación en BMSC y LSC humanas. Los ensayos analizan el potencial de diferenciación adipogénico y/o osteogénico de las células.

5 Ensayos adipogénicos: Se sembraron placas con 2×10^5 células/pocillo en medio de crecimiento. En el momento de confluencia, se llevó a cabo la diferenciación adipogénica en tres ciclos de medio de inducción/mantenimiento. El medio de mantenimiento era DMEM suplementado con FBS al 10%, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina y 1X de antibiótico/antimicótico. El medio de inducción (diferenciación) era medio de mantenimiento suplementado con dexametasona 10^{-6} M, metil-isobutilxantina 0,5 mM e indometacina 200 μM . Cada ciclo comprendía un cultivo de tres días con medio de inducción adipogénico seguido del cultivo durante un día con medio de mantenimiento adipogénico. A continuación, las células se lavaron con PBS, se fijaron con formalina al 10%, se tiñeron con aceite rojo O y se contratiñeron con hematoxilina para evaluar la diferenciación adipogénica.

15 Ensayos osteogénicos: las células se sembraron en una placa a razón de 2×10^5 células/pocillo en medio de crecimiento o en medio de diferenciación (DMEM que contenía FBS al 10%, dexametasona, β -glicerofosfato y ácido ascórbico 2-fosfato). Se cambiaron los medios en pocillos de control y de diferenciación cada 3 a 4 días durante tres semanas. Seguidamente las células se lavaron con PBS y se fijaron con formalina al 10%. Se midió la diferenciación osteogénica mediante la evaluación de la actividad de fosfatasa alcalina utilizando la tinción de von Kossa para los depósitos minerales.

Los resultados de los ensayos de diferenciación se ilustran en la Tabla 2.

Tabla 2:

Células estromales	Resultados adipogénicos	Resultados fosfatasa alc.	Resultados del von Kossa
BMSCs (+ control)	+ para la formación de lípidos	Fuertemente positivo	Fuertemente positivo
LSC nº 1 (HV-027)	Sin evidencias de formación de vacuolas lipídicas	Débilmente positivo	Negativo
LSC nº 2 (HV-029)	Sin evidencias de formación de vacuolas lipídicas	Negativo	Negativo

25 Se observó que las BMSC se diferenciaban en células grasas (adipocitos) y en células productoras de hueso (osteoblastos), mientras que las LSC no se diferenciaron en ninguno de los dos linajes.

Ejemplo 2: inmunogenicidad de las células estromales hepáticas

30 Los experimentos presentados en la presente memoria demuestran que las LSC expresaban nuevas características inmunológicas *in vitro*. Por ejemplo, se encontró que las LSC eran no inmunogénicas al mezclarlas con células T alogénicas, ya que se observó que las LSC al entrar en contacto con las células T alogénicas no indujeron a las células T a proliferar, en comparación con la cantidad de proliferación de las células T al ponerlas en contacto con PBMC alogénicas. Además, se descubrió que las LSC eran inmunosupresoras para las respuestas de células T alorreactivas. Se han descrito características inmunológicas similares para las células madre mesenquimales (MSC) (Di Nicola *et al.*, Blood 99:3838, 2002; Tse *et al.*, Transplantation 75:389, 2003; Le Blanc *et al.*, Scand. J. Immunol. 57:11, 2003), pero no para la mayoría de las poblaciones de fibroblastos derivadas de diferentes fuentes de tejido.

40 A continuación se describen los materiales y métodos utilizados en los experimentos presentados en el presente Ejemplo.

Ensayos de MLR

45 Se evaluó la inmunogenicidad de las LSC mediante la reacción mixta de linfocitos (MLR) utilizando células T como células respondedoras y las PBMC alogénicas como células estimuladoras. Se purificaron las células T a partir de bolsas de leucoféresis (AllCells, LLC, Berkeley, CA; Poietics, Rockville, MD) mediante selección negativa utilizando anticuerpos monoclonales de ratón (Serotec, Raleigh, NC) específicos para los monocitos (CD14), células B (CD19), MHC de clase II y células NK (CD56) para marcar células no T para la eliminación utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal IgG antiratón (DynaL Biotech, Inc., Lake Success, NY). La población de células remanente tras la reducción típicamente presentaba más de 85% de células CD3-positivas según el análisis de citometría de flujo. Las células T se suspendieron en medio de cultivo: medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol, antibiótico/antimicótico y suero AB humano al 5% (todos los suplementos se obtuvieron de Gibco, Carlsbad, CA, excepto el suero AB humano, que se obtuvo de PelFreez, Brown Deer, WI). Se sembraron las células T en pocillos de microtitulación ($2 \times$

10⁵/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos de baja evaporación (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) con células estimuladoras alogénicas. Las células estimuladoras se irradiaron con 5.000 rads de irradiación y utilizando una fuente de cesio (Isomedix Gammator B, Parsippany, NY) previamente a la siembra en placa en el número necesario para el experimento (habitualmente tituladas decrecientemente desde una dosis superior de 5×10^4 células/pocillo).
 5 Los cultivos se realizaron en pocillos por triplicado para cada tratamiento. Se determinó la proliferación de las células T en respuesta a aloantígenos mediante pulsado de los cultivos con ³H-timidina el 6º día de cultivo. Las células se recolectaron sobre filtros de nitrocelulosa "Filtermat" 16 horas después utilizando un recolector celular de 96 pocillos (Skatron, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) y las células sobre los filtermats se contaron utilizando un contador de centelleo Microbeta (Perkin Elmer, Turku, Finlandia).

10 Experimentos de inmunogenicidad

Se utilizó el ensayo de MLR unidireccional para evaluar la proliferación de las células T en respuesta a las LSC alogénicas. Brevemente, se cultivaron células T (2×10^5 /pocillo) con LSC alogénicas irradiadas (5.000 rads de radiación γ), PBMC autólogas o PBMC alogénicas (30.000 células/pocillo) en placas de cultivo de microtitulación de 96 pocillos. Se obtuvieron las LSC de dos donantes diferentes denominados 027 y 029. Las células T se purificaron a partir de PBMC obtenidas de cuatro donantes diferentes denominados 002, 004, 005 y 006. El enriquecimiento en células T se llevó a cabo mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (Dynal, Inc.) para eliminar las células no T. Se utilizaron anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón específicos para macrófagos/monocitos/células dendríticas (anti-CD14), células B (anti-CD19), células NK (anti-CD56) y antígenos del MHC de clase II (anti-DR) para marcar dichas células. Se utilizaron partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo IgG de cabra antiratón para separar las células en un campo magnético. La población celular resultante típicamente presentaba más de 90% de células T según el análisis de citometría de flujo utilizando mAb anti-CD3 fluoresceinado para detectar las células T. El medio de cultivo celular utilizado era medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con suero AB humano al 5%, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, pen-strep/fungizona y 2-mercaptoetanol. Los cultivos se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C durante 6 días, se pulsaron con ³H-timidina (1 μ Ci/pocillo) durante 16 horas y las células se recolectaron el día 7 utilizando un recolector celular de 96 pocillos automático. Se determinó la radioactividad incorporada mediante conteo de centelleo y los resultados se expresaron como pulsos por minuto (cpm).

30 Para que una célula del ensayo se considerase inmunogénico, debían cumplirse tres requisitos:

- 1) la célula del ensayo debía inducir una respuesta proliferativa de células T que era por lo menos 750 cpm superior a la respuesta autóloga,
- 2) el índice de estimulación (cpm de células T + de ensayo / cpm de células T + células autólogas) debe ser superior o igual a 3,0, y
- 3) debe observarse una diferencia estadísticamente significativa entre las células T + PBMC autólogas y células T + células de ensayo ($P < 0,05$, prueba t de Student).

40 Para descartar los factores genéticos (es decir, las similitudes del MHC) como la causa de la falta de capacidad de respuesta, cada célula de ensayo se cultivó con por lo menos 2 (preferentemente 3) donantes de células T diferentes. En el caso de que cualesquiera de los donantes produjese una respuesta positiva tal como se ha indicado anteriormente, la población de ensayo se consideraba inmunogénica. Mediante la utilización de dichos criterios, se concluyó que los fibroblastos derivados de piel, bazo, pulmón, tejido conectivo y material fetal eran inmunogénicos.

45 Los resultados de los experimentos de MLR utilizando cuatro donantes de células T diferentes como respondedores y las LSC como estimuladores demuestran que las LSC no son inmunogénicas (figura 1). Se observó que la respuesta de células T contra las LSC derivadas de dos donantes diferentes era similar a la respuesta contra las PBMC autólogas. También se observó que la respuesta de células T contra las LSC era significativamente menor que la respuesta a las PBMC alogénicas. Las LSC no estimulaban una respuesta significativa de ninguno de los cuatro donantes de células T según definen los tres criterios comentados anteriormente.

50 Experimentos de supresión

55 Se añadieron LSC a ensayos de MLR unidireccionales con el fin de determinar si podían suprimir la proliferación de células T alorreactivas. Brevemente, se irradiaron (5.000 R) LSC procedentes de dos donantes diferentes (027 y 029) y se añadieron a cultivos de MLR unidireccionales que comprendían células T purificadas (células respondedoras) y PBMC alogénicas irradiadas (células estimuladoras). La purificación de las células T y las condiciones de cultivo para la MLR se describen en otra sección de la presente memoria. También se añadieron fibroblastos derivados de tejido conectivo, tejido fetal, pulmón, piel y bazo a cultivos de MLR con el fin de determinar sus propiedades relativas de supresión. Todas dichas líneas celulares primarias se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las BMSC también se sometieron a ensayo para sus propiedades supresoras. Se añadieron LSC, fibroblastos y BMSC a cultivos de MLR a diferentes combinaciones de células T y PBMC a una dosis

de 30.000 células/pocillo. Se muestran los resultados como porcentaje de supresión de la respuesta de MLR base, a la que no se habían añadido fibroblastos/células estromales. Cada columna representa la supresión media de cuatro cultivos de MLR diferentes de cada tipo celular (excepto para los fibroblastos pulmonares, para los que se calculó la media a partir de tres cultivos de MLR diferentes). Se determinó la supresión mediante comparación de la respuesta que contenía las células de ensayo con la MLR de control según la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de supresión} = [1 - (\text{cpm de cultivo de MLR que contenía células de ensayo} / \text{cpm del cultivo de MLR de control})] \times 100.$$

Los resultados demuestran que las LSC de ambos donantes suprimieron la respuesta MLR en mayor grado que cualquier otro tipo celular evaluado (figura 2). Los resultados mostrados son de medias de cuatro experimentos, utilizando cada experimento una combinación diferente de células T y PBMC para la MLR. También se observaron que los fibroblastos de tejido conectivo, los fibroblastos de la piel y las células estromales de médula ósea suprimían la respuesta MLR, mientras que los fibroblastos fetales, los fibroblastos pulmonares y los fibroblastos del bazo incrementaban la respuesta MLR (un "porcentaje de supresión" negativo indica que la población celular de ensayo añadida incrementa la respuesta de MLR respecto a los niveles de control).

Ejemplo 3: células estromales hepáticas en el trasplante

Dado que las LSC suprimen las respuestas de células T alorreactivas, tal como se ha comentado en otro sitio en la presente memoria, las LSC pueden cotrasplantarse con células, tejidos u órganos inmunogénicos para prevenir el rechazo inmunológico del material trasplantado. Una ventaja de este enfoque sobre los utilizados actualmente en la técnica es que las células pueden utilizarse para establecer áreas restringidas de privilegio inmunológico en el área del trasplante sin una supresión generalizada del sistema inmunológico que pueda resultar perjudicial para el huésped.

Las propiedades inmunosupresoras de las LSC pueden aprovecharse para incrementar la supervivencia de las células, tejidos u órganos trasplantados. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que las LSC administradas en un tejido/órgano crearían un área localizada de inmunosupresión o privilegio inmunológico que ayudaría a la injertación de células, tejidos u órganos. Aunque puede inducirse la tolerancia inmunológica bajo estas condiciones, no resulta necesaria para la utilización con éxito de las LSC para la reducción y/o eliminación de una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno en un receptor de trasplante. Resulta preferente que se produzca una injertación de largo plazo de un número suficiente de LSC en el sitio deseado, en donde las LSC mantienen su fenotipo supresor.

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados en los experimentos presentados en el presente Ejemplo.

Aislamiento de las LSC:

Tal como se ha comentado en otra sección en la presente memoria, se aislaron las LSC a partir de hígados adultos cadavéricos humanos, denominados Hu027 y Hu029. Brevemente, se perfundió el hígado por la vena porta y arteria hepáticas y las células se pasaron a través de filtros de 1.000, 500, 250 y 150 µm. Se fraccionaron las células viables bajo 500xg con el procesador celular COBE (Gambro BCT, Lakewood, CO) utilizando gradientes en 2 etapas (9% y 17%; células Hu027 y Hu029) o gradientes OptiPrep al 12,5% (células H0107) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega).

Aislamiento y cultivo de células madre neurales fetales humanas:

El tejido cerebral fetal humano puede obtenerse de Advanced Bioscience Resources (Alameda, CA). El tejido se lavó con PBS/antibióticos y se extirparon las meninges previamente a la utilización del tejido cerebral deseado. Se separó el tejido remanente con ayuda de unas pinzas y se disoció adicionalmente mediante trituración con una pipeta Pasteur. A continuación, las células se peletizaron mediante centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en 10 ml de medio de crecimiento de NSC (DMEM/F12, glucosa 8 mM, glutamina, bicarbonato sódico 20 mM, HEPES 15 mM, 8 µg/ml de heparina₂, suplemento N2, 10 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de EGF). Se utilizaron las células para recubrir un matraz T-25 cm² (15 µg/ml de poliornitina durante la noche seguido de 10 µg/ml de fibronectina humana durante más de 4 horas) con un tapón ventilado y se cultivaron en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C. Las células se incubaron con factor inhibidor de leucemia (LIF) en medio de crecimiento completo con 40 ng/ml de LIF tras cultivarlas inicialmente (1 a 2 pases) en presencia de únicamente bFGF y EGF. Los cultivos se alimentaron mediante la sustitución en días alternos de 50% del medio por medio de crecimiento completo fresco. Las células se subcultivaron mediante tripsinización con tripsina-EDTA al

0,05% en PBS durante 2 a 3 minutos, seguido de la adición de inhibidor de tripsina de soja para inactivar la tripsina. Las células se peletizaron a 1.200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron en medio de crecimiento y se sembraron en matraces recubiertos a razón de 1,0 a 1,25 x 10⁵ células/cm². Las células se conservaron criogénicamente en 10% de DMSO + 90% de medio de crecimiento completo.

5

Ensayos de MLR humanos:

La inmunogenicidad de las células madre puede evaluarse mediante reacción mixta de linfocitos (MLR) utilizando células T como células respondedoras y PBMC, NSC o LSC alogénicas como células estimuladoras. En el caso de que las células estimuladoras sean inmunogénicas frente a las células T, las células estimuladoras activarán las células T e inducirán la proliferación de las mismas. Se purificaron las células T utilizadas en dichos experimentos a partir de bolsas de leucoféresis tal como se ha descrito en otra sección de la presente memoria.

10

Ensayos de MLR en ratas: Estos ensayos se prepararon de manera similar a las MLR humanas. Brevemente, se produjeron células respondedoras mediante recolección de células de nódulo linfático (LNC) cervical y mesentérico. Las células respondedoras se disociaron en una suspensión de células individuales mediante trituración de las mismas con un émbolo de jeringa contra un filtro celular (BD Falcon) en una placa de 6 pocillos. Las células respondedoras se suspendieron en un medio de cultivo similar al medio de MLR humana con la excepción de que el suero era FBS al 10% (HyClone, Logan, UT). Se sembraron LNC en pocillos de microtitulación (4 x 10⁵/pocillo) con células estimuladoras alogénicas en el número necesario para el experimento. Se irradiaron (5.000 rads) células estimuladoras antes de ser sembradas en placa. Los cultivos se realizaron en pocillos por triplicado para cada tratamiento. Se evaluó la proliferación de células T frente a aloantígenos tal como se describe en otra sección de la presente memoria.

15

20

Ensayo de Alu-PCR humana: El número de NSC humanas en hígados de rata puede cuantificarse utilizando un ensayo de PCR basado en un elemento intra-Alu descrito por Walker *et al.*, (Analytical Biochem. 315:122-128, 2003). La secuencia Alu repetitiva de origen natural presente en el ADN humano permite una mayor sensibilidad de detección comparado con las secuencias/genes de copia única. De esta manera, se cuantifica el ADN genómico de origen humano mediante PCR en tiempo real para la secuencia repetitiva Alu específicamente humana. Los cebadores utilizados para este ensayo amplifican una secuencia repetitiva nuclear intra-Alu de ~200 pb dentro de la subfamilia de Alu Yb8. La utilización de dichos cebadores fue informada por Walker *et al.* (Analytical Biochem. 315:122-128, 2003) para la detección específica de ADN humano en una cantidad de por lo menos 10 pg (~1 equivalente celular) en 2 ng de muestra de ADN de especies mixtas. Se aisló el ADN genómico a partir de hígados de rata congelados instantáneamente, utilizando el kit de aislamiento de ADN Puregene (Gentra Systems). Se cuantificó el ADN humano mediante comparación con una curva estándar de ADN específico de Alu generada a partir de poblaciones de células de rata pulsadas (en incrementos de 10 veces) con un número conocido de células humanas.

25

30

35

Cotrasplante de LSC y NSC:

40

Se seleccionaron las NSC para los experimentos siguientes debido a que las NSC representan un ejemplo de una célula madre que presenta aplicaciones clínicas significativas. Sin embargo, se encuentra contemplado que pueda utilizarse cualquier célula, tejido u órgano en los experimentos siguientes. Los experimentos siguientes se refieren al papel de las LSC en la supresión de una respuesta inmunológica contra las NSC trasplantadas en un receptor.

45

Las NSC expresan antígenos del MHC de clase I:

Se prepararon NSC a partir de tejido fetal humano utilizando métodos bien conocidos de la técnica y se sometieron a aproximadamente 13 pases de cultivo. Las células se evaluaron para moléculas de membrana celular inmunológicamente relevantes mediante citometría de flujo. Se observó que la población de NSC no expresaba marcadores hematopoyéticos (CD45, CD14 y CD34), moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) o moléculas del MHC de clase II. Sin embargo, las NSC no expresaban el marcador de célula madre CD133, así como los antígenos del MHC de clase I. La expresión de las moléculas de clase I habitualmente indica que las células resultarían reconocidas por las células T alorreactivas y resultarían rechazadas en el caso de que se trasplantasen a un receptor alogénico. Basándose en la exposición presentada en la presente memoria, las LSC son una excepción a este dogma porque se ha demostrado que las LSC no resultan inmunogénicas para las células T en las MLR.

50

55

Las NSC estimulan la proliferación de las células T alogénicas

Se evaluó la inmunogenicidad de las NSC mediante la reacción mixta de linfocitos (MLR) unidireccional utilizando células T como células respondedoras y NSC irradiadas como células estimuladoras. La MLR, que mide la respuesta proliferativa de células T frente a aloantígenos, predice la supervivencia de las células alogénicas *in vivo*. Se prepararon NSC a partir de tejido fetal humano y se sometieron a aproximadamente 13 pases de cultivo. Partiendo

60

de una dosis elevada de aproximadamente 5×10^4 células/pocillo, las células se titularon en decrementos de 3 veces a modo de células estimuladoras. Se prepararon células T purificadas (2×10^5 células/pocillo) procedentes de un donante no relacionado a modo de células respondedoras. Se utilizaron PBMC autólogas como células estimuladoras de control. Tal como se muestra en la figura 3, las NSC estimularon un grado significativo de proliferación de células T comparado con las PBMC autólogas, las cuales no estimularon una cantidad significativa de proliferación de células T a la dosis celular más alta ($P < 0,05$, prueba t de Student). Estos resultados demuestran que las NSC alogénicas resultan reconocidas por las células T e inducen una respuesta inmunológica funcional.

La capacidad de las LSC de proteger a las NSC del rechazo *in vivo* puede examinarse utilizando un modelo xenogénico o un modelo alogénico. Aunque el modelo clínico puede incluir el trasplante xenogénico de células, así como un modelo alogénico, en la presente memoria se describe un modelo xenogénico como prueba de principio. El modelo xenogénico comprende los criterios siguientes:

1) NSC humanas como las células donantes, 2) LSC de rata debido a que las LSC humanas se ha demostrado que son supresoras de las respuestas de células T alorreactivas, y 3) se seleccionó el hígado como sitio de implantación debido a la facilidad de administración de las células por la vena porta, la facilidad de acceso de las células inyectadas al sistema inmunológico y la capacidad de recuperación de las células inyectadas. Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, las LSC inyectadas por vía intraportal pueden quedar retenidas en el hígado. Además, debido a que las NSC presentan aproximadamente el tamaño de las LSC, también pueden quedar atrapadas en el hígado tras la administración portal. La utilización de NSC humanas como la única célula humana en este modelo permite evaluar la injertación utilizando una técnica de PCR específica para las secuencias de ADN de Alu humanas. El modelo descrito en la presente memoria además puede utilizarse para determinar si las NSC y las LSC inducen una respuesta de células T en los nódulos linfáticos de los animales receptores mediante la utilización de estas células en ensayos MLR unidireccionales.

Supresión de la MLR xenogénica de rata frente a la humana por parte de las LSC de rata

Pueden prepararse MLR xenogénicas entre células de rata y humanas con el fin de evaluar si las LSC de rata pueden suprimir esta respuesta. En estos experimentos se utilizan LSC de rata alogénicas para el receptor aunque pueden utilizarse LSC de cualquier origen para suprimir las respuestas MLR. Por ejemplo, también pueden utilizarse LSC de rata autólogas respecto al receptor.

Se recolectaron nódulos linfáticos (LN) de rata de Fisher, se disociaron formando una suspensión de células individuales y se sembraron en pocillos de microtitulación (4×10^5 /pocillo) a modo de células respondedoras en la MLR. Se irradiaron NSC humanas y PBMC alogénicas y se sembraron a razón de 1×10^5 células por pocillo a modo de células estimuladoras. Se titularon LSC y fibroblastos de la cepa de rata ACI en las MLR a una dosis alta, de 5×10^4 células/pocillo y dosis decrecientes en un factor de 2 hasta 3.125 células/pocillo. Las condiciones de cultivo para la MLR de rata son las descritas en otra sección de la presente memoria. La supresión se determina comparando la MLR de control (sin LSC) con las MLR que contienen fibroblastos o LSC. Se llevó a cabo la evaluación estadística utilizando la prueba t de Student.

Determinación de la supervivencia de las NSC trasplantadas

Se diseñaron experimentos para evaluar la supervivencia de las NSC *in vivo* tras la administración con fibroblastos de control o LSC. Puede utilizarse una proporción 1:1 de LSC a NSC, que debería resultar adecuada para la supresión *in vivo* en vista de que una proporción 1:3 de LSC a PBMC estimuladoras resulta suficiente para suprimir la MLR *in vitro*. Además, se cree que las PBMC son estimuladores más fuertes de las células T que las NSC, justificando por lo tanto la proporción 1:1 de LSC a NSC.

Se mezclaron las NSC humanas (5×10^6 células) con fibroblastos dérmicos de rata de cepa ACI (5×10^6 células) y se inyectaron por vía intraportal en un volumen de 200 μ l en cada una de 25 ratas de Fisher. Se produjeron fibroblastos dérmicos a partir de muestras de piel obtenidas de las ratas ACI y se expandieron utilizando métodos similares para expandir las LSC tal como se describe en otra sección de la presente memoria. Otro grupo de 25 ratas de Fisher recibió la inyección por vía intraportal de NSC humanas (5×10^6 células/rata) mezcladas con un número igual de LSC de rata de la cepa ACI (5×10^6 células/rata). Se sacrificaron cinco ratas de cada grupo los días 1, 7, 14, 21 y 28 después de la inyección. Se extirparon los hígados, se congelaron instantáneamente y se sometieron al ensayo AluPCR tal como se ha descrito en otra sección de la presente memoria, con el fin de evaluar la injertación de las NSC humanas.

Se cree que las LSC pueden mediar en la supresión localizada *in vivo* y extender la supervivencia de células xenogénicas en el hígado. De esta manera, se recuperó un mayor número de NSC humanas de ratas que habían recibido LSC que de ratas que habían recibido NSC con fibroblastos no supresores. La mayor diferencia entre estos dos grupos se esperaría que se produjese tras 1 a 2 semanas, cuando se ha activado la respuesta inmunológica frente a las NSC xenogénicas. Puede utilizarse un ensayo de PCR para detectar las NSC humanas que han

sobrevivido el trasplante mediante la medición de la secuencia repetitiva Alu específicamente humana.

Determinación de la sensibilización de las células T a células inyectadas en ratas receptoras.

5 Se diseñaron experimentos para determinar si las NSC humanas cotrasplantadas con fibroblastos de rata o con LSC de rata sensibilizaban las células T reactivas en nódulos linfáticos periféricos de ratas receptoras. Puede utilizarse un ensayo MLR unidireccional para evaluar dicha sensibilización.

10 Se extirparon nódulos linfáticos (LN) cervicales y mesentéricos procedentes de los dos grupos de 5 ratas cada uno (NSC humanas + fibroblastos de rata frente a NSC humanas + LSC de rata) que se sacrificaron en el punto temporal final, un mes después de la inyección. Los LN de las ratas se disociaron en una suspensión de células individuales y se utilizaron como células respondedoras en ensayos de MLR con NSC humanas donantes irradiadas; se utilizaron fibroblastos de rata y LSC de rata a modo de células estimuladoras (5×10^4 células/pocillo). Los grupos de control utilizados en dichos experimentos pueden ser células de bazo de cepa Fisher singénica a modo de estimuladores (fondo), LNC cultivadas en medio solo y células estimuladoras irradiadas cultivadas en medio solo. Se comparó la respuesta media de cada población estimulada con las respuestas de fondo a las células de bazo singénicas.

15 Sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, en el caso de que las NSC humanas xenogénicas sensibilizasen las ratas receptoras, las células T procedentes de ratas receptoras deberían producir una respuesta secundaria en el ensayo MLR frente a las NSC humanas utilizadas como células estimuladoras. En contraste, en el caso de que las LSC administradas en el receptor del trasplante evitaran una respuesta inmunológica a las NSC humanas tras el cotrasplante de las LSC y las NSC humanas, las células T receptoras deberían producir una respuesta MLR primaria. En el caso de que las LSC trasplantadas tolerizasen las células T receptoras frente a las NSC tras el cotrasplante de LSC con NSC, deberían producir respuestas reducidas en una MLR.

25 Ejemplo 4: cotrasplante de LSC y células de islotes:

30 Las LSC pueden utilizarse en el cotrasplante con células de islote alogénicas para el tratamiento de la diabetes. Se introducen islotes alogénicos en un receptor mediante la inyección de islotes con LSC en la vena porta del receptor que lleva las células al hígado, en donde los islotes se establecen y funcionan produciendo insulina en respuesta a la glucosa. Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría en particular, el cotrasplante de LSC con células de islote alogénicas puede funcionar protegiendo los islotes del rechazo por parte del huésped sin utilizar fármacos inmunosupresores. Las LSC también pueden sobrevivir durante periodos prolongados de tiempo en el hígado debido a que es su tejido de origen.

35 Resultará evidente para el experto en la materia que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones en los métodos y composiciones de la presente invención sin apartarse del espíritu o alcance de la invención. De esta manera, se pretende que la presente invención cubre las modificaciones y variaciones de la presente invención con la condición de que se encuentren comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células estromales hepáticas para la utilización en el tratamiento de un receptor de trasplante para reducir en dicho receptor una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, de manera que en el receptor del trasplante las células efectoras presentan una respuesta inmunológica reducida contra el aloantígeno.
- 10 2. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células efectoras son células T.
- 15 3. Células según la reivindicación 2, en las que dichas células T proceden de un donante y el aloantígeno procede de dicho receptor, o en las que dichas células T proceden de dicho receptor y el aloantígeno procede de un donante.
- 20 4. Células según la reivindicación 2, en las que dichas células T se encuentran presentes en un trasplante.
- 25 5. Células según la reivindicación 1, en las que el trasplante es de médula ósea, o en las que el trasplante es de células madre hematopoyéticas, o en las que el trasplante es de células madre neurales.
- 30 6. Células según la reivindicación 1, en las que, previamente a dicha administración en un receptor de trasplante de células estromales hepáticas, dichas células estromales hepáticas han sido expandidas en cultivo.
- 35 7. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células efectoras son células T procedentes de un donante previamente activado mediante la puesta en contacto de las células T con una célula o un tejido procedente del receptor previamente al trasplante con el fin de activar las células T, y en las que además dicha respuesta inmunológica es la reactivación de dichas células T.
- 40 8. Células según la reivindicación 1, en las que las células estromales hepáticas se administran en el receptor del trasplante para tratar el rechazo del trasplante por parte del receptor.
- 45 9. Células según la reivindicación 1, en las que las células estromales hepáticas son células estromales hepáticas humanas.
- 50 10. Células según la reivindicación 1, que comprenden además la administración en el receptor de un agente inmunosupresor.
- 55 11. Células según la reivindicación 1, en las que el trasplante es un órgano sólido.
- 60 12. Células según la reivindicación 11, en las que el órgano sólido se selecciona de entre el grupo que consiste de corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.
13. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células estromales hepáticas se administran en el receptor previamente a dicho trasplante, o en las que dichas células madre estromales hepáticas se administran en el receptor concurrentemente con dicho trasplante, o posteriormente a la implantación del trasplante.
14. Células según la reivindicación 13, en las que dichas células estromales hepáticas se administran como parte del trasplante.
15. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células estromales hepáticas se administran por vía intravenosa en el receptor.
16. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células efectoras son células de un receptor de dicho trasplante del donante.
17. Células según la reivindicación 1, en las que dichas células estromales hepáticas han sido genéticamente modificadas.
18. Células estromales hepáticas para la utilización en el tratamiento de un receptor de un trasplante con el fin de reducir en dicho receptor una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, comprendiendo el tratamiento:

trasplantar en un receptor de trasplante un trasplante tratado con células estromales hepáticas en una

cantidad efectiva para reducir una respuesta inmunológica de células efectoras contra un aloantígeno respecto a las células efectoras, de manera que en el receptor del trasplante las células efectoras producen una respuesta inmunológica reducida contra el aloantígeno.

- 5 19. Células estromales hepáticas para la utilización en la reducción de una respuesta inmunológica de células efectoras contra células alogénicas, comprendiendo la utilización el tratamiento de las células efectoras con células estromales hepáticas.
- 10 20. Células según la reivindicación 18 ó 19, en las que dichas células efectoras son células T.
21. Células según cualquiera de las reivindicaciones 1, 18 y 19, en las que las células estromales hepáticas se obtienen de un hígado humano.

Figura 1.

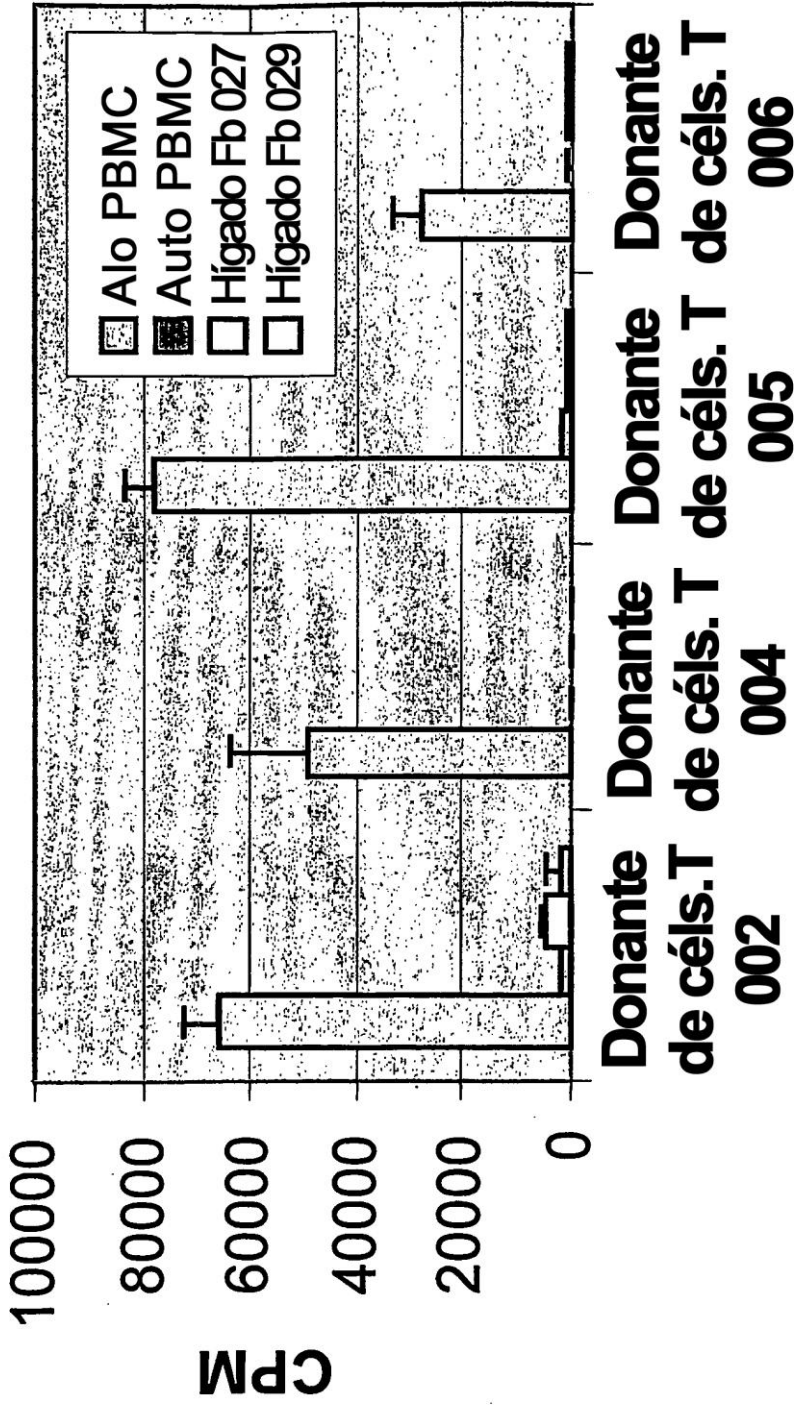
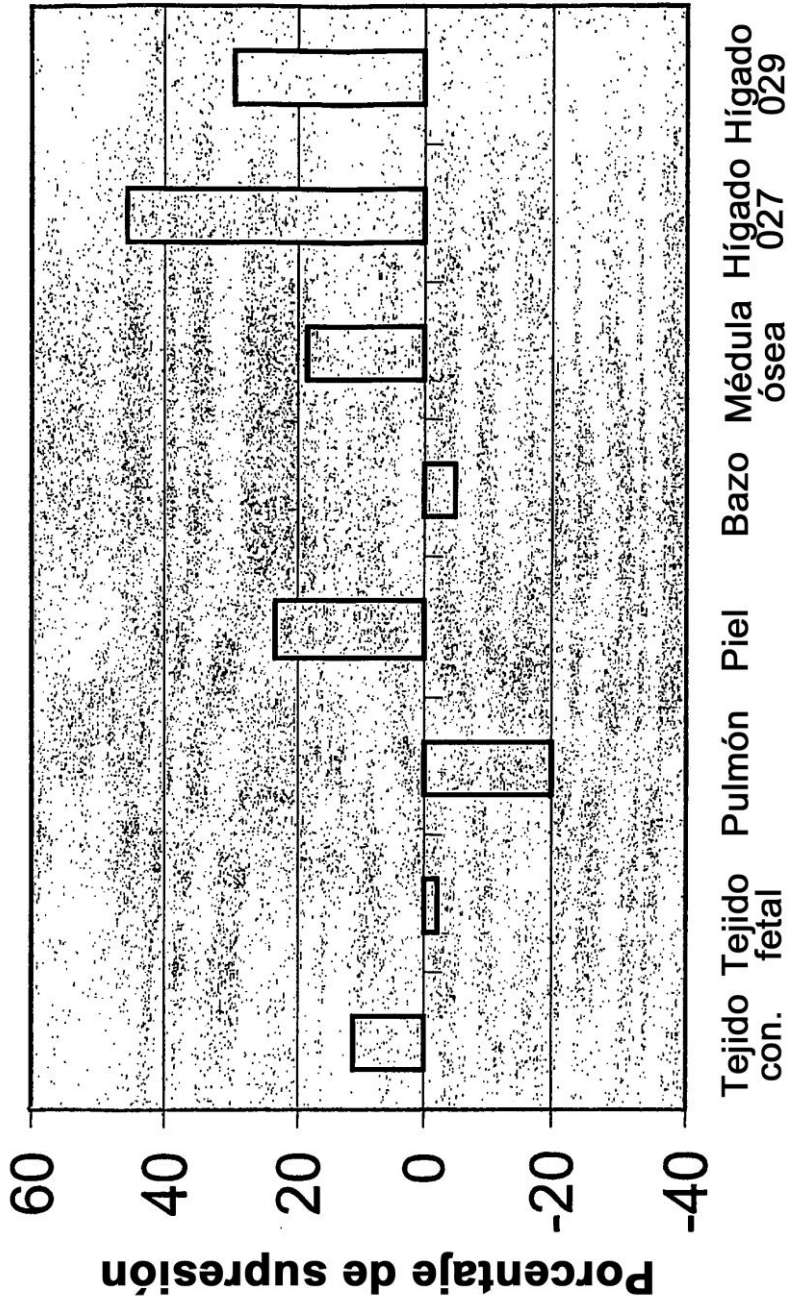


Figura 2



Origen tisular de fibroblastos/células estromales

Figura 3

